

524903

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2004年2月26日(26.02.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/016808 A1

(51) 国际分类号: C12Q 1/68, B08B 3/12

(21) 国际申请号: PCT/CN2002/000877

(22) 国际申请日: 2002年12月10日(10.12.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 02128860.7 2002年8月16日(16.08.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。北京博奥生物芯片有限责任公司(CAPITAL BIOCHIP COMPANY, LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华西路甲2号, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 李刚(LI, Gang) [CN/CN]; 邢婉丽(XING, Wanli) [CN/CN]; 吴瑞阁(WU, Ruige) [CN/CN]; 郭昊(GUO, Min) [CN/CN]; 程京(CHENG, Jing) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

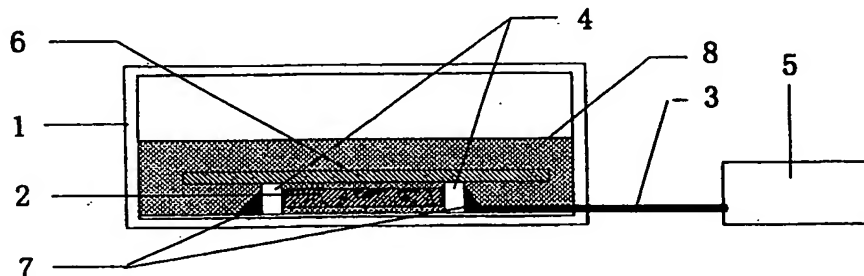
本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR WASHING SOLID SUBSTRATE WITH ULTRASONIC WAVE AFTER HYBRIDIZATION REACTION

(54) 发明名称: 利用超声波对杂交反应后固体基质进行清洗的方法及装置



(57) Abstract: A method and apparatus for washing solid substrate with ultrasonic wave after hybridization reaction are provided. The method includes (1) putting the solid substrate into a container having a washing solution, on which the hybridization reaction has been completed, (2) using an ultrasonic generator to produce a certain strength of ultrasonic wave and transmit it into the washing solution, (3) washing the substrate by means of the cavitation effect being produced in the washing solution by the ultrasonic wave. Since the cavitation bubbles in the washing solution can produce intensive efflux and local microslipstream against the solid surface, evidently reduce the liquid surface tension and friction and enhance the liquid flow, non-specific adsorbate and deposit bound weakly on the solid substrate can be washed down rapidly.

[见续页]

WO 2004/016808 A1



(57) 摘要

利用超声波对杂交反应后固体基质进行清洗的方法及装置，该方法及装置是将已完成杂交反应的固体基质放入盛有清洗液的容器中，利用超声波发生器产生一定强度的超声并将其传导至清洗液中，利用超声在清洗液中产生的空化效应进行清洗。由于清洗液中的空化气泡会对固体表面产生强烈射流及局部微冲流，显著减弱液体表面张力及摩擦力，增强液体的流动，从而可以将固体基质表面结合的较弱的非特异性吸附及沉淀快速清洗掉。

利用超声波对杂交反应后固体基质进行清洗的方法及装置

技术领域

5 本发明涉及一种利用超声波手段促进杂交反应后对固体基质进行清洗的方法及其装置，特别是涉及生物芯片杂交反应后清洗过程的方法及其装置。此方法及装置可应用于临床诊断、生命科学基础研究、农业及环境监测等技术的领域。

背景技术

10 非特异性吸附是杂交反应中经常遇到的现象，它往往使得生物和医学杂交检测结果难以分析，因此非特异性吸附的清洗是生物和医学分析检测过程中一个非常重要的环节。目前常用的清洗方法是待清洗的固体基质表面区域浸入清洗液中，通过机械振荡来完成的。这种方法虽然简便，但是清洗效果差，耗时长，背景信号高，均匀性不好，且因为清洗装置存在运动部件，不易实现集成化和微型化。

发明公开

15 本发明的目的是缩短杂交反应后清洗时间、提高杂交信号与背景信号的对比度。并提供一种结构简单，成本低廉，操作简便，耗时少，易于实现自动化，并可用于微型反应系统的杂交反应清洗装置。

20 本发明的目的是通过如下技术方案实现的：一种利用超声波对杂交反应后的固体基质进行清洗的方法，该方法是将已完成杂交反应的固体基质放入盛有清洗液的容器中，利用超声波发生器产生一定强度的超声并将其传导至清洗液中，利用该超声在清洗液中产生的空化效应促进清洗。

25 本发明还提供了一种实施上述清洗方法的装置，该装置包括盛有清洗液的容器，放置在清洗液中的已完成杂交反应的固体基质，其特征在于：在所述的已完成杂交反应后的固体基质的上方、下方或四周至少放置一个超声波谐振元件，该超声波谐振元件与谐振电路连接。

实施清洗时，首先将已完成杂交反应的固体基质放入清洗液中，然后开通超声波谐振电路，驱动超声波谐振元件产生超声，利用此超声传导至清洗液中产生的空化效应促进清洗。因为清洗液中的空化气泡会对固体表面产生强烈射流及局部微冲流，显著减弱液体的表面张力及磨擦力，并破

坏固-液界面的附面层，增强液体的流动，从而可以将固体基质表面结合较弱的非特异性吸附及沉淀快速清洗掉。

附图说明

图 1 为本发明提出的实施例的装置结构示意图。

5 图 2 为本发明提出的实施例中采用压电陶瓷片作为超声波谐振元件的正面视图。

图 3 为本发明提出的实施例中采用压电陶瓷片作为超声波谐振元件的背面视图。

10 图 4 为本发明提出的实施例与常规机械振荡清洗方法所得到的杂交荧光信号比较图。

图 5 为本发明提出的实施例与常规机械振荡清洗方法得到的背景荧光的比较图。

实施发明的最佳方式

下面结合附图进一步说明本发明的具体实施：

15 实际应用时，首先将已完成杂交反应的固体基质放入清洗液中，使固体基质的待清洗表面与清洗液接触；超声波谐振元件可以与清洗液之间直接接触，也可以通过环氧树脂等粘性胶贴附于盛有清洗液容器的外壁，位置可以是容器的上部、下部或四周；超声波谐振元件的材料可以是压电陶瓷材料，也可以是石英材料。超声波谐振元件的形状可以是圆柱形、锥形、圆筒形、立方形任何有利于产生超声波谐振的元件的形状。超声波谐振元件的体积可以在 10 立方微米到 1000 立方厘米之间变化。超声波谐振元件所产生的超声波频率可以在 20kHz 到 100MHz 之间变化。超声波发生器的功率可以在 1W 到 200W 之间变化。超声波发生器产生超声波的方式可以连续进行或间断进行。

25 图 1 为本发明的一个具体实施例，该实施例利用超声波促进基因芯片的杂交反应后清洗过程。将一直径为 2.5 厘米频率为 1.7MHz 的圆形压电陶瓷片 2 贴附于一尺寸为 8.5cm×5cm×2cm 的塑料盒 1 中，压电陶瓷片 2 通过塑料盒 1 侧壁所钻小孔引出导线 3 与超声波谐振电路 5 相接。超声波谐振电路 5 的输出功率为 20W。然后将导线引出孔用环氧树脂胶密封。压电陶瓷片 2 边缘套有环形橡皮密封圈 4，橡皮密封圈 4 通过环氧树脂胶 7 固

30

定于塑料盒 1 底部，其作用是使焊点与清洗液隔离，防止引起短路。清洗时，待清洗的基因芯片 6 浸没于塑料盒 1 中盛装的清洗液 8 中。

图 2 和图 3 为本发明采用压电陶瓷片作为超声波谐振元件的电极排布图。图 2 为压电陶瓷片正面视图，图 3 为压电陶瓷片背面视图：9 指示超声压电陶瓷片表面所镀金属电极，3 指示与超声压电陶瓷片焊接的导线，10 指示超声压电陶瓷片背面裸露的压电材料。

图 4 和图 5 为本发明提出的实施例与常规清洗方法所得到的杂交荧光信号及背景荧光强度的比较图。如图 4 和图 5 所示实施例的清洗条件 1 为用机械振荡清洗固液杂交体系 15 分钟，（振荡频率：80 转/分钟，振幅：15mm），清洗条件 2 为以 1.7MHz 的压电陶瓷片在 20W 功率下清洗同样的固液杂交体系 3 分钟。清洗时，基因芯片置于压电陶瓷片上方约 2mm 处，有探针的一面背对压电陶瓷片，并加入清洗液浸没基因芯片，清洗液体积为 10mL，清洗液成份为 0.2% SDS。

点阵 1 和点阵 2 所用的探针、杂交样品及杂交条件均相同。探针为 35 个碱基的寡核苷酸，通过共价方式连接于醛基修饰的玻璃片上，样品长度为 1045bp 的 DNA，其中一段与探针完全匹配，样品 DNA 链上带有 Cy5 荧光标记分子，杂交条件为 65℃、90 分钟，检测方法为激光诱导荧光检测，所用仪器为 ScanArray 4000，检测器光电倍增管（PMT）的设置值为仪器最大值的 75%，激光光源功率均设定为仪器最大值的 80%。

从图 4 和图 5 中的信号值可以看出，超声辅助条件下清洗 3 分钟可达到与常规清洗相同的清洗效果，其杂交荧光信号（图 4）及背景荧光强度值（图 5）均无显著差异。此实验已重复 8—9 次，实验表明利用超声的空化效应可在较短的时间达到与机械清洗相同的清洗效果，从而可以加快整个检测的速度。

25 工业应用

本发明与常规杂交反应清洗技术相比，可以显著缩短清洗时间（实施例结果显示利用超声波可使基因芯片杂交后的清洗时间比常规机械振荡方法缩短 5 倍），提高杂交信号与背景信号的对比度。另外，本发明装置结构简单（核心元件仅有超声谐振元件和相应谐振电路及盛装清洗液的容器），没有运动部件，易于实现集成化和自动化。

权利要求书

1. 一种利用超声波对杂交反应后的固体基质进行清洗的方法， 该方法是将已完成杂交反应的固体基质放入盛有清洗液的容器中， 利用超声波发生器产生一定强度的超声并将其传导至清洗液中， 利用该超声在清洗液中产生的空化效应促进清洗。
5
2. 按照权利要求 1 所述的清洗方法， 其特征在于： 所述超声波发生器的功率可在 0.1W 到 200W 之间变化。
3. 按照权利要求 1 所述的清洗方法， 其特征在于： 超声波发生器所产生的超声波频率可在 20kHz 到 100MHz 之间变化。
- 10 4. 按照权利要求 1 所述的清洗方法， 其特征在于： 所述的超声波发生器产生超声波的方式可以连续进行或间断进行。
5. 实施如权利要求 1 所述对杂交反应后的固体基质进行清洗的装置， 该装置包括盛有清洗液的容器， 放置在清洗液中的已完成杂交反应的固体基质， 其特征在于： 在所述的已完成杂交反应的固体基质的上方、 下方或四周至少放置一个超声波谐振元件， 该超声波谐振元件与谐振电路连接。
15
6. 按照权利要求 5 所述的装置， 其特征在于： 超声波发生器的谐振元件与清洗液可以直接接触或间接接触。

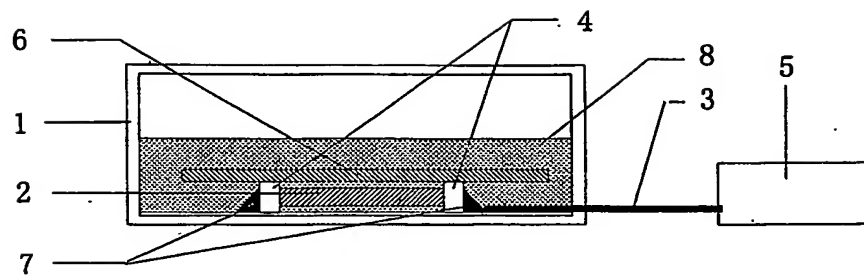


图 1

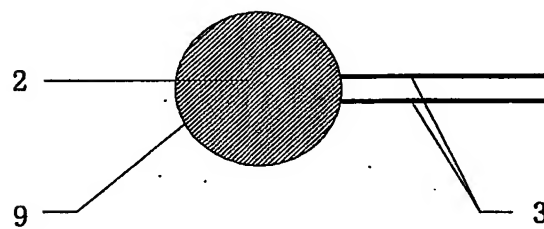


图 2

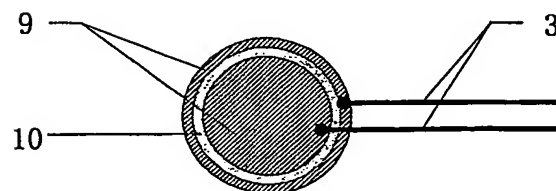


图 3

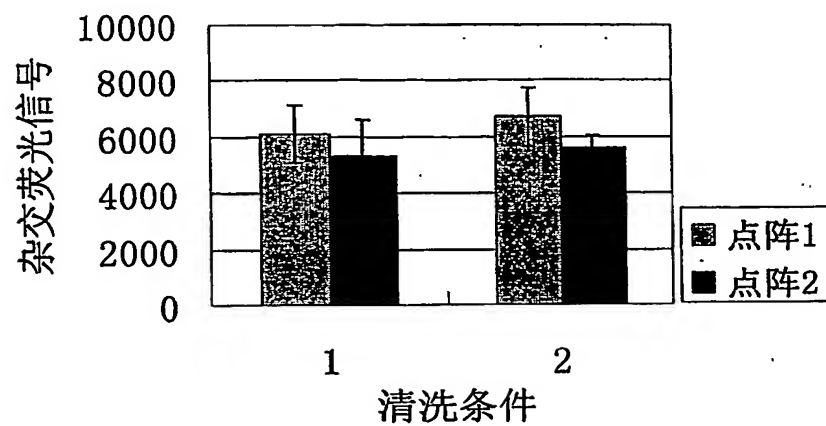


图 4

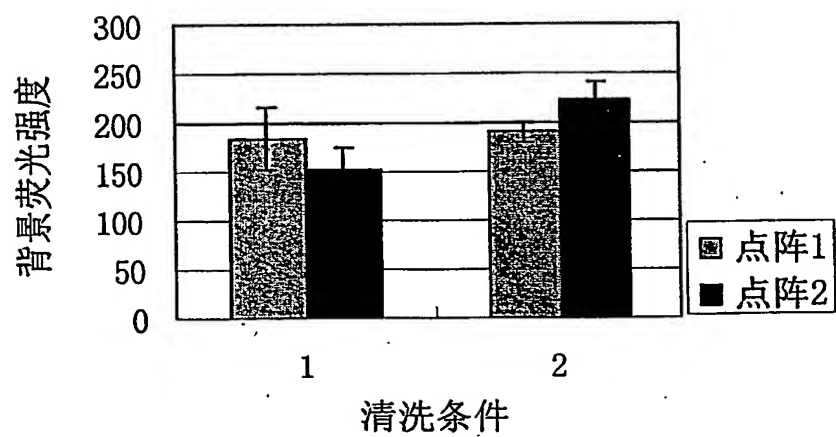


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00877

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12Q1/68, B08B3/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ G01N, C12Q, B08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Document (1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)


WPI, EPOCOD, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN, A, 1321890(NANJING YILAI GENE MEDICAL CO., LTD.) 14. November 2001(14.11.01), entire document	1-6
A	CN, A, 1314494(SHANGHAI BODE GENE CO., LTD.) 26. September 2001(26.09.01), entire document	1-6
A	CN, Y, 2495656(ZHAO YUJIE) 19. June 2002(19.06.02), entire document	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15. May 2003(15.05.03)	Date of mailing of the international search report 05 JUN 2003: (05.06.03)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer :  Telephone No. 86-10-62093916

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00877


C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP ,A, 751644(CHEMICAL INDUSTRIAL CORPORATION) 28.February 1995(28.02.95), entire document	1-6
A	JP, A, 9327671(CORPORATION) 22.December 1997(22.12.97), entire document	1-6
A	DE, A1, 4121304(Siemens AG) 14.January 1993(14.01.93), entire document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN02/00877

Patent document Cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication data
CN, A, 1321890	14.11.01	None	
CN, A, 1314494	26.09.01	None	
CN,Y,2495656	19.06.02	None	
JP,A,9327671	22.12.97	None	
JP,A,751644	28.02.95	None	
DE, A1, 4121304	14.01.93	None	

A. 主题的分类		
IPC ⁷ C12Q1/68, B08B3/12		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)		
IPC ⁷ G01N, C12Q, B08B		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
中国专利文献 (1985~)		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)		
WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN, A, 1321890(南京益来基因医学有限公司) 14.11 月 2001(14.11.01), 全文	1-6
A	CN, A, 1314494(上海博德基因开发有限公司) 26.09 月 2001(26.09.01), 全文	1-6
A	CN, Y, 2495656(赵雨杰) 19.06 月 2002(19.06.02), 全文	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: “A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 “L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 “X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 “&” 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 15.5 月 2003(15.05.03)		国际检索报告邮寄日期 05. 6月 2003 (05. 06.03)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451		授权官员  电话号码: 86-10-62093916

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	JP ,A, 751644(大日本インキ化学工业株式会社) 28.2 月 1995(28.02.95), 全文	1-6
A	JP, A, 9327671(株式会社カイジヨー) 22.12 月 1997(22.12.97), 全文	1-6
A	DE, A1, 4121304(Siemens AG) 14.1 月 1993(14.01.93), 全文	1-6

国际检索报告
关于国际专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00877

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN, A, 1321890	14.11.01	无	
CN, A, 1314494	26.09.01	无	
CN,Y,2495656.	19.06.02	无	
JP,A,9327671	22.12.97	无	
JP,A,751644	28.02.95	无	
DE, A1, 4121304	14.01.93	无	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.